

マウス精巣吸引針生検後の精細管傷害および 対精細胞遅延型過敏反応の解析

坪 井 啓

岡山大学大学院医歯学総合研究科 泌尿器病態学
(指導責任者：公文裕巳教授)

Testicular fine needle aspirations cause histological injury and immunological response in mouse testis

Hiromu Tsuboi

Department of Urology, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan
(Director : Prof. H. Kumon)

The purpose of this study was to define the histopathological change and immunological response occurring as a result of testicular fine needle aspirations (TEFNAs) in C3H/HeN mice. TEFNA (one-, five-, or twenty-time aspiration) from the left testis was performed on day 0, and bilateral testes were examined histologically on days 21 and 49. Delayed-type hypersensitivity (DTH) was measured as the immunological response. Significant reduction of left testicular weight was observed only in the twenty-time aspiration group, on days 21 and 49. Histological examinations in the left testes showed a significantly high incidence of spermatogenetic disturbance with focal chronic inflammation and degenerative changes on day 21 and 49 after twenty-time TEFNA. Similar but less extensive changes were noted after five-time TEFNA. As for the weight and histology of the right testes, there was no significant change after the left-side TEFNA treatments. However, we revealed that the DTH response to autologous testicular cells was significantly elevated in the twenty-time aspiration group on day 21. In this animal model, TEFNA caused definite damage to the seminiferous tubules and induced DTH against testicular cells. Further study may be required to determine the clinical relevance of such findings to the testes of azoospermic men treated with TEFNA.

キーワード：精巣生検 (testicular biopsy), 精巣損傷 (testicular injury), 精子形成 (spermatogenesis),
遅延型過敏反応 (delayed-type hypersensitivity), 自己免疫性精巣炎 (autoimmune orchitis)

緒 言

精巣生検は、男性不妊症の病理組織的診断や受精、妊娠を目的とした生殖医療技術で精細胞獲得のために用いられる手法である。近年、Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) などの生殖医療技術の発達に伴い、無精子症、乏精子症などの不妊患者における精巣内精子の回収を目的とした精巣生検が広く行われるようになった。生検手技として、従来、精巣白膜に小切開を加え精巣組織片を得る開放生検法が用いられてきたが、近年、注射針を用いて精巣組織を穿刺吸引する吸引針生検や、biopsy gun を用いて精巣組織を採取する方法の簡便性、有用性が報告されてい

る¹⁻⁶⁾。特に、吸引針生検法は開放生検手技に比べより低侵襲で^{7,8)}、また精巣の複数ヶ所を生検することでより質の高い精子を得られる可能性があることも報告され⁹⁾、不妊臨床の場で普及しつつある^{5,10)}。

しかしながら、これらの利点の反面、精巣針生検の副作用、合併症についての臨床的な報告はほとんど成されていない。複数ヶ所の吸引穿刺によって起こる顕微鏡レベルでの精巣組織への直接的傷害についてはほとんど知られておらず、文献的にもその危険性について検討を行った研究報告はほとんどない。さらに、片側精巣の物理的傷害により自己の精細胞に対する遅延型過敏反応が惹起され、反対側精巣に自己免疫性精巣炎が発生することが、臨床的にも動物実験でも報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。臨床的には、外傷性事故や手術などによる片側精巣の傷害により、反対側の精巣にリンパ球浸潤を伴う外傷性の自己免疫性精巣炎が発生したとの報告が散見され^{12,13)}、診療上の注意が喚起されている。

平成19年11月9日受理
〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1
電話：086-235-7287 FAX：086-231-3986
E-mail：tsuboi_h@kohjin.ne.jp

また、この疾患の精巣外傷を伴う動物実験モデルとして、マウスを用いた実験的自己免疫性精巣炎モデルが報告され、免疫性の男性不妊症の研究にも使用されている¹²⁾。この実験系では、C3H/HeN マウスの片側精巣を挫滅することにより、その28日目以降に反対側精巣に造精機能障害を伴う自己免疫性精巣炎が誘導されている。同時に、細胞性免疫である遅延型過敏反応が自己の精細胞に対して誘導されており、これは、血液精巣関門により自己の免疫系より隔離された状態にあった精細胞が、精巣組織の挫滅による損傷により内因性の抗原として陰嚢皮下に免疫されたことによるものである。すなわち、自己免疫性精巣炎の発症機序には、精巣損傷による精細胞の自己免疫系への暴露が強く関わっていると考えられる。これらの報告をふまえると、現在臨床の場で施行されている精巣吸引針生検の安全性は、精細胞に対する自己免疫の観点からは未だ確立されたものではないと思われる。

今回我々は、精巣吸引針生検の精細管におよぼす直接的影響を検討する目的で、マウス精巣において針穿刺吸引後に起こる精巣傷害について組織学的解析を行った。さらに、この片側精巣損傷によって誘導される対精細胞遅延型過敏反応および反対側の自己免疫性精巣炎の有無についても検討を加えた。マウスを用いた本研究により、精巣吸引針生検を行った側の精巣では穿刺回数に応じた精細管傷害が認められ、また、その穿刺回数によっては精細胞に対する遅延型過敏反応が誘導されることが明らかとなった。しかしながら、片側精巣の吸引針穿刺のみでは、反対側の精巣に自己免疫性精巣炎に伴う明らかな組織学的精細管傷害は認められなかった。特に、精巣吸引針生検により対精細胞遅延型過敏反応が誘導されることを示した報告は、臨床および動物実験いずれにおいても我々の調べ得た限りでは本研究が世界初であり、精巣吸引針生検の臨床的な安全性の見地からも考察を加えたい。

材料と方法

岡山大学動物実験施設より供給された雄の生後7週の純系 C3H/HeN マウスを用いた。このマウスを用いた実験的自己免疫性精巣炎モデルは、以前より外傷性の自己免疫性精巣炎の研究に使用されている¹²⁾。マウスの麻酔は50mg/kg のペントバルビタールの腹腔内投与にて行い、精巣におけるすべての処置は麻酔下に施行した。左精巣を23G針で長軸方向に均等に経皮的吸引穿刺（1回、5回、20回）したマウスそれぞれ10匹からなる3群を、吸引穿刺後21日目、49日目において正常コントロール群10匹と比較検討した。項目として、左右精巣重量、組織学的な精巣傷害の有無および程度、自己免疫性精巣炎の発生の有無、対精細胞遅延

型過敏反応の程度の解析を行った。穿刺回数の設定としては、臨床的にも可能性のある1回、5回と過度の傷害を目的として20回を設定した。また、20回の針穿刺後用指的に左精巣を完全に挫滅した10匹の実験的自己免疫性精巣炎マウスモデルを作成し、緒言で述べたような対精細胞遅延型過敏反応誘導および右側精巣における自己免疫性精巣炎発症の陽性コントロール群とした。挫滅に際しては、マウスを仰臥位にして左手の親指と人指し指で挫滅側である左側の鼠径部を圧迫し、左精巣が腹腔内に移動するのを避けた状態で、右手の親指と人指し指とで左精巣が触知されなくなるまで挫滅した。

組織学的解析のために、マウス屠殺後採取した精巣を直ちに短軸平面で半切し、Bouin 液中において室温で24時間浸潤固定した。その後、70%、90%、95%、100%エタノールおよびキシレン液中で順次脱水を行った後、パラフィンに包埋した。厚さ5 μ mのパラフィン切片を作製し、脱パラフィンを行った後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。一つの精巣あたり約1mm間隔で3切片を短軸平面において作成し、光学顕微鏡を用いて観察した。組織学的な精細管傷害の程度の定量化には Hypospermatogenesis score を用いた^{11,12)}。すなわち、それぞれの精巣より得た3切片を無作為に100倍～400倍の倍率で観察し、成熟した精細胞の消失や剥離の認められる精細管の頻度に応じて次のように分類した。0：0%、1：1～5%、2：6～25%、3：26～50%、4：51～100%。

対精細胞細胞性免疫の程度の指標となる遅延型過敏反応の程度を明らかにするため、同系マウスからの viable な精細胞を惹起抗原として用い、精細胞に対する遅延型足蹠反応を測定した。1 $\times 10^6$ 個の精細胞を50 μ lの Hanks 液に調整し右後肢足蹠内に注射し、左後肢足蹠内には同量の Hanks 液を注射した。24時間後に左右の後肢足蹠の厚さを microdial thickness gauge (Peacock 社)にて測定し、左右の差 ($\times 0.1$ mm) を遅延型足蹠反応とした¹⁵⁾。

実験結果は、平均値に標準誤差を付記し表した。統計学的解析には Mann-Whitney U-test を用いた。各解析の p 値が0.05未満である場合、統計学的に有意な差と見なした。

結 果

左精巣を20回穿刺後49日目の左右精巣の肉眼的写真を図1Aに示した。正常コントロール群の精巣に比べ、直接傷害された左精巣では明らかに萎縮が見られたが、右精巣に関しては萎縮を認めなかった。

左精巣を1回、5回、20回穿刺後21日目、49日目の左精巣重量を図1Bに示した。1回、5回の穿刺では正常コントロール群に比べ重量に有意差は認められなかったが、20

回の穿刺では経過とともに精巣重量は減少し、いずれの観察日においても有意な差が認められた。次に、左精巣を1回、5回、20回穿刺した群および挫滅した群における21日目、49日目の右精巣重量を図1Cに示した。1回、5回、20回の穿刺群では正常コントロール群と比べ有意差は認められなかったが、挫滅群において49日目では有意な低下が認められた。

正常コントロール群49日目の正常造精能を持つ組織像を図2Aに示した。これに対して、左精巣を5回穿刺後49日目の左精巣の組織像(図2B)では精細胞の消失、剥離を伴う空砲化した精細管が散在していた。さらに、20回穿刺後21日目の左精巣の組織像(図2C)では空砲化、萎縮した精細管に加え、間質の一部に多数のリンパ球の浸潤が認

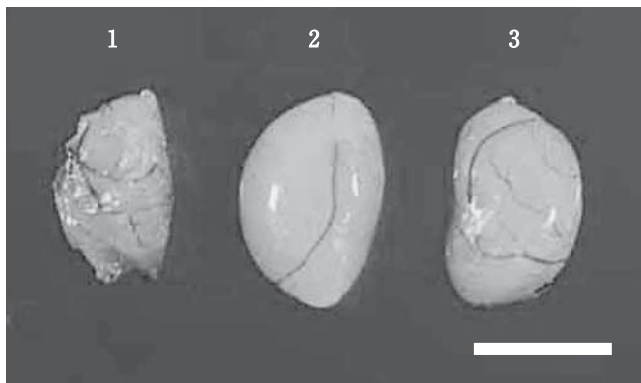
められた。20回穿刺後49日目の左精巣の組織像(図2D)では精細胞の消失、剥離を伴う萎縮精細管が広範に認められた。20回穿刺後49日目の右精巣の組織像(図2E)は正常組織像と同様で明らかな組織学的変化を認めなかったが、自己免疫性精巣炎発症の陽性コントロールである挫滅群49日目の右精巣の組織像(図2G)では図2Cと同様に、空砲化した精細管および間質に多数のリンパ球浸潤が認められた。また、挫滅群21日目の右精巣組織では組織学的変化は明らかでなく(図2F)、49日目では異物型巨細胞の出現も確認され(data not shown)、従来より報告されている実験的自己免疫性精巣炎モデルの組織学的所見と一致していた^{12,15)}。

左精巣において組織学的な精細管傷害の程度を Hypo-spermatogenesis score を用いて定量化したところ、図3に示すように5回および20回穿刺群において、21日目以降有意な score の上昇が認められた。また、穿刺回数が増えるにしたがい score が上昇する傾向が認められた。

対精細胞遅延型足蹠反応では、図4に示すように20回穿刺群の21日目で一過性に有意な上昇を認め、遅延型過敏反応の誘導が確認された。しかしながら、1回および5回の穿刺後では有意な上昇は認められなかった。遅延型過敏反応誘導の陽性コントロールである挫滅群においては、21日目以降で遅延型足蹠反応の有意な上昇が認められた。

考 察

今回のマウスを用いた研究では、20回の比較的頻回の吸引針生検群において穿刺側精巣の萎縮、重量低下が認められたが、1回、5回の穿刺では有意な差を認めなかった。



1 : Lt. testis, 20回, day 49. Bar : 5 mm
2 : Rt. testis, 20回, day 49.
3 : Lt. testis, 正常コントロール

図1A 左精巣20回穿刺後49日目の左右精巣の肉眼的写真

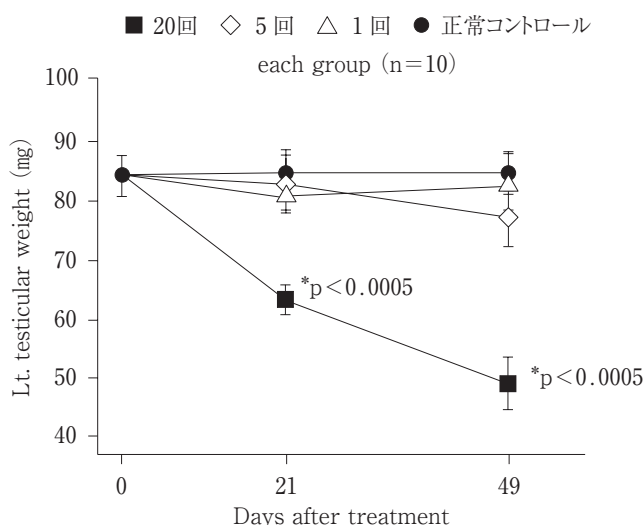


図1B 左精巣重量の変化

*: 正常コントロールと比べて有意差認めた

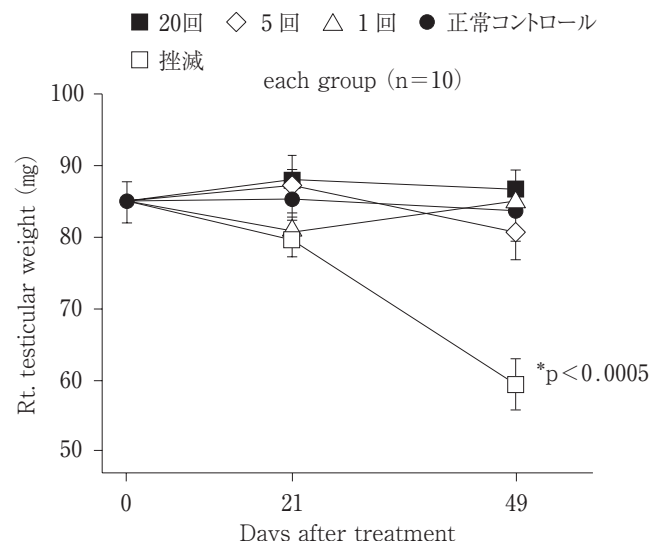


図1C 右精巣重量の変化

*: 正常コントロールと比べて有意差認めた

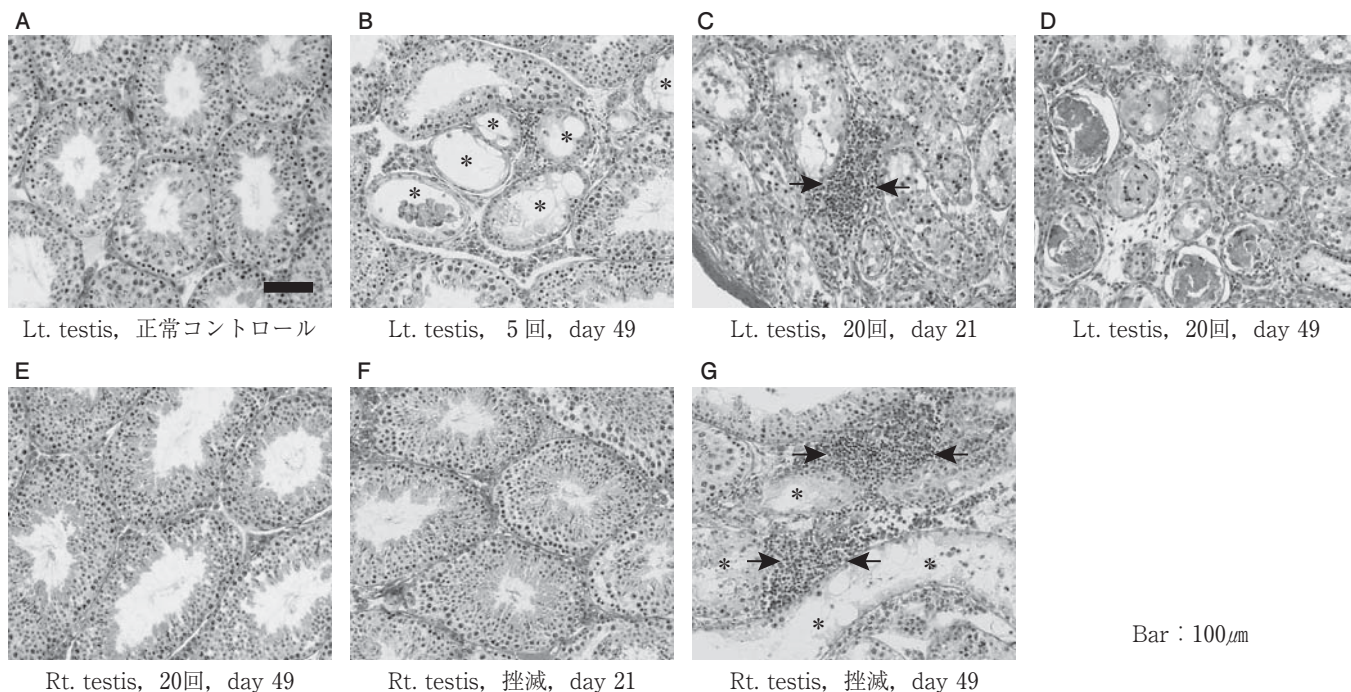


図2 精巣組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色)
* : 精細胞の消失, 剥離を伴う精細管 Arrow heads : リンパ球の浸潤

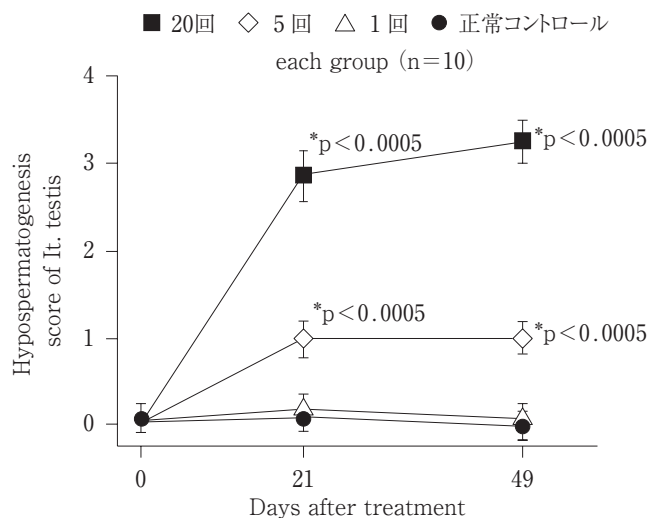


図3 左精巣組織の Hypospermatogenesis score の変化
* : 正常コントロールと比べて有意差認めた

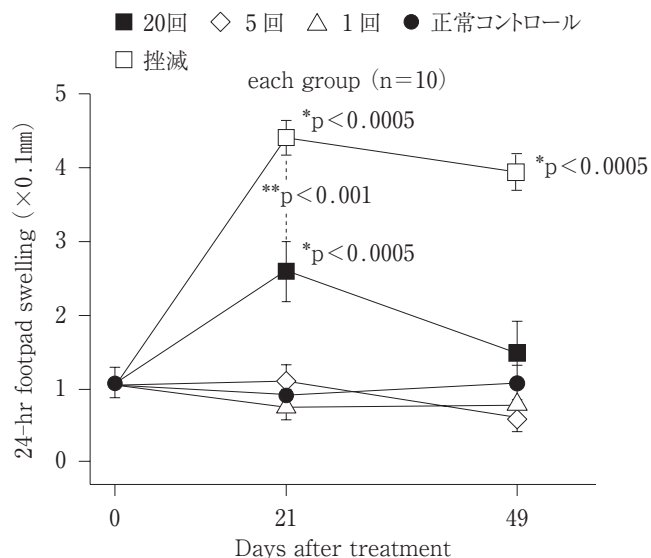


図4 対精細胞遅延型足蹠反応の変化
* : 正常コントロールと比べて有意差認めた ** : 20回穿刺群と挫滅群で有意差を認めた

また, 組織学的解析では, 20回穿刺群のみならず5回穿刺群においても有意な精細管傷害が認められ, 吸引針生検により物理的に引き起こされたものと考えられた. 近年, ラット片側精巣を7回吸引針生検した後の同側精巣の肉眼的, 組織学的所見が報告された¹⁶⁾. これによると, 処置後31日目に精巣は肉眼的に萎縮し, 顕微鏡的には出血性変化

や石灰化を伴った精巣組織の凝固壊死および広範な精細管の退行性変化が認められている. すなわち, 穿刺側精巣における精細管傷害の発生機序として, 針吸引穿刺の直接的傷害による出血および組織壊死が精細胞脱落の主たる原因となると考えられる. 今回, 穿刺回数の増加に伴い Hypospermatogenesis score が上昇する傾向が認められたこと

も、この機序を裏付けるものと考えられた。

片側精巣の物理的損傷後に精細胞に対する自己免疫性が獲得された結果、自己免疫性精巣炎による対側精巣の精細管傷害が誘発されることが、以前より臨床的に報告されている^{12,13)}。この病態として、主に細胞性免疫由来の遅延型過敏反応の誘導が原因となることが知られている^{11,12,17-19)}。今回の実験における左精巣挫滅群はその陽性コントロールであり、挫滅後49日目には右精巣間質に広範なリンパ球浸潤を伴う精細管傷害が認められた。この実験的自己免疫性精巣炎マウスモデルにおいては、挫滅された左精巣組織が内因性の抗原として陰嚢部に免疫された状態になっていると考えられ、細胞性免疫による自己精細胞への遅延型過敏反応がその病態の背景にあるとされる¹²⁾。さらに、リンパ球のT細胞の機能を抑制し、また、Tリンパ球が関与する自己免疫疾患に対して有効性を持つ薬剤のシクロスポリンAをこのマウスモデルに腹腔内投与すると、精細胞に対する遅延型過敏反応が抑制されたとの報告が成されている¹⁴⁾。すなわち、自己の精細胞に対する精巣局所および全身的なTリンパ球を介した細胞性免疫の活性化が、自己免疫性精巣炎の本態と考えられる。

今回、20回吸引穿刺群の21日目において、穿刺した左精巣では変性した精細管に接する間質の一部に多数のリンパ球の浸潤が認められ、また、精細胞に対する遅延型足蹠反応の誘導が確認された。これらの所見は、実験的自己免疫性精巣炎モデルである左精巣挫滅群のマウスで認められた所見と極めて類似していることから、この2群では精細胞に対する免疫反応性が同様の機序で高まっていると考えられる。また、この2群において、片側精巣に対する物理的傷害の程度と傷害後21日目に誘導された遅延型足蹠反応の程度が相関していたことも興味深い。いずれにしても20回穿刺群の21日目には、吸引穿刺した左精巣局所において、リンパ球浸潤を伴う精細胞を抗原とした免疫応答が起きていると考えられる。このことは、精細胞に対する遅延型過敏（足蹠）反応の有意な上昇として本研究で間接的に証明された。すなわち、吸引針生検により血液精巣閉門が物理的に破壊され精細胞が免疫系に暴露された結果、精細胞に対する自己免疫が誘導された可能性が考えられた。さらに、20回穿刺群21日目の左精巣において、精細管傷害とその局所でのリンパ球浸潤のいずれもが観察されたことをふまえると、誘導された対精細胞遅延型過敏反応が吸引針生検による機械的な精細管傷害をさらに悪化させた可能性も示唆された。

吸引針生検後21日目において20回穿刺群で認められた遅延型足蹠反応の上昇の程度は、その陽性コントロールである挫滅群と比較すると有意に低い結果であった。このこと

の理由としては、20回穿刺群では挫滅群に比べると物理的な傷害による精細胞の暴露量が少なく、そのため自己免疫反応が弱くなったものと考えられる。また、20回穿刺群49日目において遅延型足蹠反応に有意な上昇が認められなかったことは、21日目で誘導された自己免疫性がシステマティックな免疫恒常性により正常化された可能性を示唆する。今回、左精巣20回穿刺群では、そのいずれの時期の右精巣においても挫滅群の右精巣で認められたような自己免疫性精巣炎が発生しなかった。これは、20回の吸引穿刺群では対側精巣に影響を及ぼすほどの対精細胞自己免疫性が獲得されなかったからであると考えられる。その理由としても、20回穿刺群では挫滅群に比べると物理的な傷害による精細胞の暴露量が少ないことが考えられた。

近年、精子採取を目的とした吸引針生検および biopsy gun による精巣生検の簡便性、有用性について多くの報告が成されている¹⁻⁶⁾。今回の精巣吸引針生検の副作用に関する解析はマウス精巣において行われており、ヒトにおいて実際に今回報告したような現象が認められるかどうかは明らかでない。特に、以前より臨床的に報告されている外傷性の自己免疫性精巣炎が^{12,13)}、精巣生検した局所および反対側精巣において発生するかどうかは定かでない。また、精巣針生検後の短期の合併症についての臨床的検討では、原則として、この手技の安全性についての言及が成されている^{20,21)}。しかしながら、男性不妊症の臨床の場合において精巣針生検を行う場合には、直接的な精細管傷害による造精機能障害の可能性や、これまでに報告が認められないため極めて可能性は低いと思われるが生検に伴う自己免疫性精巣炎の発生の危険性について、患者に十分に説明する必要があると思われる。また、生検本数の増加はその直接的精細管傷害の程度をより悪化させると考えられ、比較的低侵襲とされる針生検においても必要最低限の生検本数にとどめるべきであると考えられた。

結 論

マウス精巣において、吸引針生検後の精細管傷害および対精細胞遅延型過敏反応の解析を行った。組織学的解析では、5回および20回穿刺の精巣において吸引針穿刺による直接的な精細管傷害が認められた。対精細胞遅延型足蹠反応では、20回穿刺群の21日目で一過性に有意な上昇を認められ、遅延型過敏反応の誘導が確認された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導賜りました岡山大学大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学講座：公文裕巳教授、永井 敦先生（現 川崎医科大学泌尿器科教授）、渡部昌実先生に心より感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Gottschalk-Sabag S, Glick T, Weiss DB : Fine needle aspiration of the testis and correlation with testicular open biopsy. *Acta Cytol* (1993) 37, 67-72.
- 2) Gottschalk-Sabag S, Glick T, Bar-On E, Weiss DB : Testicular fine needle aspiration as a diagnostic method. *Fertil Steril* (1993) 59, 1129-1131.
- 3) Turek PJ, Cha I, Ljung BM : Systematic fine-needle aspiration of the testis : correlation to biopsy and results of organ "mapping" for mature sperm in azoospermic men. *Urology* (1997) 49, 743-748.
- 4) Mahajan AD, Ali NI, Walwalkar SJ, Rege JD, Pathak HR : The role of fine-needle aspiration cytology of the testis in the diagnostic evaluation of infertility. *BJU Int* (1999) 84, 485-488.
- 5) Lewin A, Reubinoff B, Porat-Katz A, Weiss D, Eisenberg V, Arbel R, Bar-el H, Safran A : Testicular fine needle aspiration : the alternative method for sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* (1999) 14, 1785-1790.
- 6) Aridogan IA, Bayazit Y, Yaman M, Ersoz C, Doran S : Comparison of fine-needle aspiration and open biopsy of testis in sperm retrieval and histopathologic diagnosis. *Andrologia* (2003) 35, 121-125.
- 7) Qublan HS, Al-Jader KM, Al-Kaisi NS, Alghoweri AS, Abu-Khait SA, Abu-Qamar AA, Haddadin E : Fine needle aspiration cytology compared with open biopsy histology for the diagnosis of azoospermia. *J Obstet Gynaecol* (2002) 22, 527-531.
- 8) Craft I, Tsirigotis M, Courtauld E, Farrer-Brown G : Testicular needle aspiration as an alternative to biopsy for the assessment of spermatogenesis. *Hum Reprod* (1997) 12, 1483-1487.
- 9) Arora VK, Singh N, Bhatia A, Rashmi, Radhakrishnan G, Jain BK, Agarwal N : Testicular fine needle aspiration cytology for the diagnosis of azoospermia and oligospermia. *Acta Cytol* (2000) 44, 349-356.
- 10) Zukerman Z, Orvieto R, Avrech OM, Weiss DB, Gottschalk-Sabag S, Bar-On E, Rufas O, Bar-Hava I, Ben-Rafael Z, Fisch B : Is diagnostic testicular fine needle aspiration necessary in azoospermic men before sperm aspiration/extraction for intracytoplasmic sperm injection cycles? *J Assist Reprod Genet* (2000) 17, 93-96.
- 11) Itoh M, Hiramane C, Hojo K : A new murine model of autoimmune orchitis induced by immunization with viable syngeneic testicular germ cells alone. I. Immunological and histological studies. *Clin Exp Immunol* (1991) 83, 137-142.
- 12) 坂本泰樹, 松本哲朗, 水之江義充, 熊澤浄一 : マウスにおける片側精巣損傷により誘導される“交感性精巣炎”と自己免疫応答. *日泌尿会誌* (1995) 86, 1751-1756.
- 13) Suominen JJ : Sympathetic auto-immune orchitis. *Andrologia* (1995) 27, 213-216.
- 14) Sakamoto Y, Matsumoto T, Kumazawa J : Cell-mediated autoimmune response to testis induced by bilateral testicular injury can be suppressed by cyclosporin A. *J Urol* (1998) 159, 1735-1740.
- 15) Watanabe M, Kashiwakura Y, Kusumi N, Tamayose K, Nasu Y, Nagai A, Shimada T, Daida H, Kumon H : Adeno-associated virus-mediated human IL-10 gene transfer suppresses the development of experimental autoimmune orchitis. *Gene Ther* (2005) 12, 1126-1132.
- 16) Shufaro Y, Prus D, Laufer N, Simon A : Impact of repeated testicular fine needle aspirations (TEFNA) and testicular sperm extraction (TESE) on the microscopic morphology of the testis : an animal model. *Hum Reprod* (2002) 17, 1795-1799.
- 17) Sakamoto Y, Matsumoto T, Mizunoe Y, Haraoka M, Sakamoto M, Kumazawa J : Testicular injury induces cell-mediated autoimmune response to testis. *J Urol* (1995) 153, 1316-1320.
- 18) 坂本泰樹, 松本哲朗, 熊澤浄一 : マウスにおける自己免疫性男性不妊症モデルの確立. *日泌尿会誌* (1999) 90, 763-768.
- 19) 空本慎慈, 竹中生昌, 平峯千春, 北条憲二 : マウス精巣細胞の生後発達に伴う精巣細胞の自己免疫原性の発達の検討. *日泌尿会誌* (1994) 85, 1763-1772.
- 20) Fahmy I, Kamal A, Aboulghar M, Mansour R, Serour GI, Shamloul R : Percutaneous aspiration biopsy using an intravenous catheter for testicular sperm retrieval in patients with obstructive azoospermia. *Reprod Biomed Online* (2004) 9, 102-105.
- 21) Carpi A, Menchini Fabris FG, Palego P, Di Coscio G, Romani R, Nardini V, Rossi G : Fine-needle and large-needle percutaneous aspiration biopsy of testicles in men with nonobstructive azoospermia : safety and diagnostic performance. *Fertil Steril* (2005) 83, 1029-1033.